

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/00</p>		A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/65036 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. November 2000 (02.11.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03465 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. April 2000 (17.04.00)  (30) Prioritätsdaten: 199 18 949.8 27. April 1999 (27.04.99) DE</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>	
<p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>		<p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHTENTHALER, Hartmut [DE/DE]; Im Kennental 17, D-76227 Karlsruhe (DE). SCHWENDER, Jörg [DE/DE]; Seltbachstrasse 5, D-76327 Pfinztal (DE). REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).</p>			
<p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>			
<p>(54) Title: OVEREXPRESSION OF A DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DESOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE IN PLANTS</p>			
<p>(54) Bezeichnung: ÜBEREXPRESSION EINER DNA-SEQUENZ CODIEREND FÜR EINE I-DES-OXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT REDUKTOISOMERASE IN PFLANZEN</p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for producing plants containing increased quantities of tocopherols, vitamin K, carotenoids, chlorophylls and polyterpenes by overexpression of a DXPRI gene.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	VN	Vietnam
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland		
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

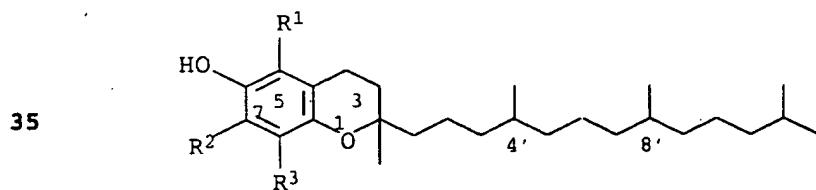
Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

5 Beschreibung

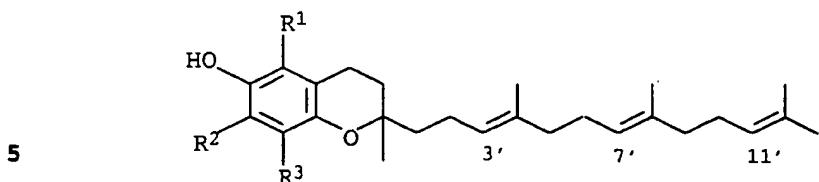
Die Erfindung betrifft eine DNA kodierend für ein Polypeptid mit 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase(DXPRI)-Aktivität pflanzlichen Ursprungs. Zudem betrifft die Erfindung die 10 Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit DXPRI-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen,Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen, speziell die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem 15 Gehalt an Tocopherolen,Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bis- 20 her die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

25 Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten 30 des Tocotrienols (2a- d):



1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 40 1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$



2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$

2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = CH_3$ ,  $R^2 = H$

10 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = R^3 = CH_3$

2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = H$ ,  $R^3 = CH_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

15 Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits beispielsweise der Tocopherol-Gehalt bzw. der Gehalt des gewünschten Stoffwechselendproduktes bereits in Gewebekultur erfassbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre beispielsweise die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, beispielsweise die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthesegene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C<sub>5</sub>-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. 40 Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophylle, Tocopherole und Vitamin K) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

45 Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C5), dem Isopentenyl-

pyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch *in vivo* Fütterungsexperimente mit C<sup>13</sup> gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird (Abbildung 1). Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat Synthase (DOXS) vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylose-5-phosphat umgewandelt (Lange et al, 1998; Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997; Lichtenthaler et al, 1997; Sprenger et al, 1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung durch die DXPRI in 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und im weiteren zu IPP umgesetzt (Arigoni et al, 1997; Zeidler et al, 1998). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytosoma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflußt ist (Bach & Lichtenthaler, 1993). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C10) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C15) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C20) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C40-Vorläufer für Carotinoide.

Bei gemischten Prenyllipiden ist die Isopren-Seitenkette verschiedener Länge mit Nicht-Isopren Ringen verbunden wie beispielsweise ein Porphyrin-Ring bei Chlorophyll a und b. Die Chlorophylle und Phylloquinone enthalten eine C20 Phytyl-Kette, in der nur die erste Isopren-Einheit eine Doppelbindung enthält. GGPP wird durch die Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase (GGPPOR) zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homo-

gentisinsäure überführt wird. Das Chorismat wird einerseits über Erythrose-4-Phosphat, 3'-Dehydrochinat, 3'-Dehydroshikimat, Shikimat, Shikimat-3-Phosphat und 5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat gebildet ( Abb. 1 ). Dabei werden Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat umgesetzt. Die oben beschriebene Homogentisinsäure wird anschließend an PPP gebunden, um den Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als 10 Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\alpha$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

15 In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktonal beeinflußen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol. Biol. 22(4), 589-602 (1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701 (1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624 (1996)).

20 25 30 35 Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.

40 Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXPRI)-Gens in den Pflanzen.

45 Um beispielsweise den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in die Tocopherol-Biosynthese zu verstärken, wurde die Bildung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-P als essentiellem Ausgangssubstrat

für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Pflanzen die Aktivität der DXPRI durch Überexpression des DXPRI-Gens aus *Arabidopsis thaliana* erhöht. Dies kann prinzipiell auch durch Expression homologer oder heterologer DXPRI-Gene erreicht werden. Eine Nukleotidsequenz codierend für eine DXPRI wurde aus *E.coli* beschrieben ( Accession Nummer AB 013300; Kuyama et al., 1998; Takahashi et al., 1998).

In Beispiel 1 wird erstmals ein pflanzliches DXPRI-Gen (Abb. 2, SEQ-ID No. 1) aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben und in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten wird der DXPRI-Nukleotidsequenz aus *Arabidopsis thaliana* eine Transitsignalsequenz (Abb. 3, Abb. 4) vorangestellt. Fragment A (529 bp) in Abbildung 4 beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DXPRI. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DXPRI-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

Das durch die zusätzliche Expression des DXPRI-Gens nun vermehrte zur Verfügung stehende 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-P wird weiter in Richtung Tocopherole, Carotinoide, Vitamin K, Chlorophylle und Polyterpene umgesetzt.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DXPRI-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Antisensekonstrukte sowie homologe bzw. heterologe pflanzliche DXPRI-Gene wurden unabhängig voneinander in Pflanzen transformiert (Abb. 5). Fragment A (529 bp) in Abbildung 5 beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase (Abbildung 3). Fragment E beinhaltet das Gen der DXPRI in Antisense-Orientierung. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Messungen an DXPRI-Antisensepflanzen ergaben bezüglich des Gehaltes an Tocopherolen und Carotinoiden eine drastische Abnahme. Dies belegt den direkten Einfluß der

plastidären pflanzlichen DXPRI auf die Synthese von Carotinoiden und Tocopherolen.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz

5 SEQ-ID No. '1 aus *Arabidopsis thaliana*, die für eine DXPRI oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion  
10 in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DXPRI kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen verleihen.

15

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende  
20 der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DXPRI-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle  
25 Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind  
30 Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 6 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- 45 - PNOS: Nopaline-Synthase-Promotor

- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder 5 Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 10 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

15

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DXPRI-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward 20 et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch 25 Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen 30 beispielsweise die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 35 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und 45 Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DXPRI-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DXPRI-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transit-  
5 peptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. En-  
10 quist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

15 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).

20 25 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DXPRI-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DXPRI-Gens 30 in die Chloroplasten vom DXPRI-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären DXPRI oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet 35 ist.

Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem 40 ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
45 CCTCGCCATGGCTCTGCCTTCTCAACTTCCCTTCTCTCACTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGTGCG

TAAGGTACCGGCGATCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAATGAGACTGCGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

5

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTCCGGCTAA  
ATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCGTACTCCTCCGCCGCCGCCGCCGTG  
TAAGGTACCGGCGATCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAATGAGACTGCGCTG

10 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
15 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTCCGGCTAA  
ATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCGTACTCCTCCGCCGCCGCCGCCGTG  
TAAGGTACCGGCGATCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAATGAGACTGCCGGGG  
ATCC\_BamHI

20 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DXPRI kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DXPRI-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

35

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 40 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze 45 sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DXPRI-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination.

Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnitt-  
5 stellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restrikti-  
onsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,  
Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Trans-  
versionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerre-  
pair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten  
10 Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffü-  
llen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden  
der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das An-  
15 hängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schou-  
ten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die  
durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis  
vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natür-  
licherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen  
20 Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt wer-  
den.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadeny-  
lierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-  
25 Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, ins-  
besondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids  
pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff)  
oder funktionelle Äquivalente.

30 Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven  
Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpep-  
tid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthal-  
ten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz  
KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

35 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für  
ein DXPRI-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19,  
kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu trans-  
formieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien  
40 können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen,  
insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen,  
verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder  
Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend  
in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von  
45 Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F.  
White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic  
Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von

S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DXPRI-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DXPRI kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzlich 10 che funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

15

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. 20 pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung 25 einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen der 30 Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie 35 deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen 40 und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyll und Polyterpenen eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird 45 als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-  
transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme,  
das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte  
particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation  
5 trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion  
und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genann-  
ten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques  
for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and  
Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic  
10 Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Phy-  
siol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben.  
Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor  
kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans-  
formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.  
15 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können  
ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen,  
insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja,  
20 Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf,  
Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschie-  
denen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem  
verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung  
gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

25 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DXPRI-Gen kodie-  
ren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotid-  
sequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle  
Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der  
30 hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch che-  
mische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze  
angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere  
35 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich  
isolierten für eine DXPRI kodierende Sequenz, welche weiterhin  
die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutio-  
nen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen  
eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise  
40 auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung  
mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DXPRI-Nukleotid-  
sequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die  
weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz  
oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnitt-  
45 stellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

5 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DXPRI-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die 10 DXPRI-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden 15 vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu 20 nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein DXPRI-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren 25 Hilfe ein Nachweis auf DXPRI-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DXPRI-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

30 Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen, Carotinoiden und Polyterpenen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DXPRI-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht genetisch 35 modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherolen beispielsweise ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression 40 des DXPRI-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DXPRI-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DXPRI-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DXPRI-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

10 Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie 15 transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- 20 und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

25 Da es sich bei diesem Biosyntheseweg um einen ausschließlich chloroplastidär-lokalierten Stoffwechselweg handelt, bietet er optimale Targetenzyme für die Entwicklung von Inhibitoren. Da sich nach heutigem Stand der Technik kein mit der *Arabidopsis thaliana* DXPRI identisches oder ähnliches Enzym in anderen höheren Organismen befindet, ist davon auszugehen, daß Inhibitoren 30 sehr spezifisch auf Pflanzen wirken sollten. Der Wirkort eines Inhibitors, Fosmidomycin (3-(N-formyl-N-hydroxyamino)-propyl-phosphonsäure; Fujisawa Pharmaceutical Co.) konnte als DXPRI identifiziert werden. Im biochemischen Assay findet man eine effektive Hemmung der enzymatischen Aktivität (Abb. 7). Folgende 35 Abkürzungen wurden in Abb. 7 verwendet: DOX = 1-Deoxy-D-xylulose, ME = Methylerythritol. Die gleiche Wirkung findet man in einem Pflanzenassay, in dem Gerstenkeimlinge nach Fosmidomycinwirkung auf ihren Chlorophyll- und Carotinoidgehalt untersucht werden.

40 Beide Substanzen, die sich aus Vorläufern des Isoprenoidstoffwechsels ableiten, sind in ihren Mengen stark erniedrigt (Abb. 8).

Durch Überexpression der für eine DXPRI kodierenden Gensequenz 45 SEQ-ID NO. 1 bzw. SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DXPRI erreicht

werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

5

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

10 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DXPRI durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA Sequenzen.

15 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen, Carotinoiden und Polyterpenen durch Expression einer DXPRI DNA-Sequenz in Pflanzen.

20 25 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

30 35 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gel-elektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhr.

40 Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitro-

gen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

##### 5 Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger 10 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

###### Beispiel 1

###### Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI

15 Ausgehend von der in der Genbank abgelegten Sequenz der *E. coli* DXPRI konnten in Gendatenbanken andere DXPRI-homologe bakterielle Proteinsequenzen identifiziert werden. Ein Vergleich der je lediglich 400 Aminosäuren langen Proteinsequenzen zeigte mehrere 20 konservierte Aminosäure-Sequenzmotive. Ein solches Motif zeigte Homologien mit einer abgelegten genomischen *Arabidopsis*-Sequenz (Accession Nummer AB009053).

25 Da die bakteriellen DXPRI-Sequenzen nahe am vermeintlichen N-Terminus eine konservierte Aminosäuresequenz aufweisen, wurde der Beginn eines funktionellen Teils der *Arabidopsis*-DXPRI-Sequenz sehr genau in abgelegten genomischen Sequenzen lokalisiert. Das C-terminale Ende der Sequenz (Stop-Codon) konnte durch einen Vergleich mit dem EST-Klon (Accession Nummer AA586087) gefunden werden. 30 Es wurde ein 1215 bp großes Fragment der DXPRI kloniert, welches durch heterologe Expression auf enzymatische Funktionalität untersucht wurde.

35 Es wurde mRNA aus *Arabidopsis thaliana* (var. Columbia) isoliert und cDNA (nach Herstellerangaben Stratagene) erzeugt. Es wurden aus den Sequenzen AB009053 und AA586087 PCR-Primer abgeleitet, mit welchen aus der hergestellten cDNA ein 1215 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wurde. Der Primer ATrv3 besitzt eine BamHI-Schnittstelle und ist so gewählt, daß nach Restriktionsverdau und 40 Ligation in pBluescript oder pET5b (Expressionsplasmid; Promega) die kodierende Sequenz ab der N-terminalen ersten konservierten Sequenz im Leserahmen der Proteinstranslation einligiert wird.

Atrv3 5' TCAGGATCCGGCGCCTCGTCAATCT 3'  
45 Atrr1 5' GACGAATTCCTTCTTCCAACAAACCAATTCT 3'

Die Primer Atrv3 und Attr1 enthielten eine BamHI- bzw. eine EcoRI-Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-Produkt (Atrv3/Attr1) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit BamHI und EcoRI verdaut. Zur Ligation wurden 5 der Vektor pET5b ebenfalls mit BamHI und EcoRI geschnitten. Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* XL1Blue (Stratagene) transformiert.

Das Plasmid pET5bAtr enthält ein Genfragment kodierend für DXPRI 10 aus *Arabidopsis thaliana*. Dessen Sequenz wurde bestimmt (Abbildung 2, SEQ-ID No.1). Die aus dem Plasmid pET5bAtr erhaltene Nucleotid-Sequenz lässt sich mit den Sequenzen AB009053 und AA586087 abgleichen. Demnach enthält die genomische Sequenz AB009053 10 Introns.

15

Beispiel 2

Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI in den Expressionsvektor pET5bAtr und Nachweis der enzymatischen Aktivität.

20

Der Expressionsvektor pET5b (Promega) ist ein Expressionsvektor für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Das Plasmid ist abgeleitet von pBR322 und trägt für die Expression einen Bakteriophage T7-Promotor. Zur Expression wird das Plasmid in einem 25 *E. coli*-Stamm vermehrt, welcher ein induzierbares Gen für die T7-Polymerase trägt (z.B. JM109(DE3); Promega). Die Expression des rekombinanten Proteins wird aktiviert über die Induktion der T7-Polymerase.

30 pET5bAtr codiert für ein Fusionsprotein mit 420 Aminosäuren Länge. Die Aminosäuren 1 bis 14 stammen aus pET5b (Fusionspeptid; Abbildung 3). Die Aminosäuren 15 bis 420 stammen aus dem klonierten DXPRI-Fragment (Abb. 2). In Abb. 3 ist die DNA-Sequenz für das Fusionspeptid unterstrichen. Aus der gesamten Sequenz lässt 35 sich ein Molekulargewicht von 45,6 kDa für das Protein berechnen.

Der transgene Stamm wurde im Anzuchtsmedium "2x YT" (pro 1 l: Bacto-Trypton 16 g, Hefe-Extrakt 10 g, NaCl 5g) inkubiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bis zu einer OD<sub>560 nm</sub> von 0,6. Nach Zu- 40 gabe von IPTG (1mM) erfolgte das Wachstum weitere 10 min bei 37°C, dann weitere 4h bei 22° bis zur Ernte. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1% NaCl gewaschen. Nach Aufbruch der Zellen (50 bis 500 ml Zellkultur (OD<sub>560 nm</sub> von 1,0) mittels French Press wurde 45 ein Protein-Rohextrakt für Enzymtests verwendet (in 4 ml Extraktionspuffer (Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, PMSF

0,1 mM). Zur Aufbewahrung wurden die Rohextrakte mit 20% Glycerin bei -20°C eingefroren.

Für den Enzymtest wurden 15 µl (auf 1 bis 7 mg Protein/ml ver-  
5 dünnnt) Proteinextrakt mit MnCl<sub>2</sub> (1 mM), NaF (5 mM), NADPH<sub>2</sub> (0,5 mM) und <sup>14</sup>C-1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (0,25 mM, 3 kBq) für 30 min. bei 30°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte bei 100°C (30 sec.) durch Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (auf 100 mM) und alkalischer Phosphatase (0.5 units). Das Dephosphorylieren des Produk-  
10 tes erfolgte für 2h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch die dünnenschichtchromatographische Auftrennung des Produktes auf Kieselgel 60 (Merck) mit Aceton/Ethylacetat/Wasser (50+50+2) mit anschließender Auswertung via Instant Imager. Man erhält 1-Deoxy-D-xylulose (DOX; Rf 0,4) und Methylerythritol (ME; Rf 0,2). Ab-  
15 bildung 9 gibt die dünnenschichtchromatographische, autoradiographische Auswertung nach heterloger Expression der DXPRI aus *Ara-bidopsis thaliana* in *E. coli* und Enzymassay bei Einsatz verschiedener Gesamt-Proteinkonzentrationen (µg Protein/µl) wieder.  
K = Kontrolle *E. coli* JM 109 (DE3) mit Plasmid pET5b ohne DXPRI.  
20 Proben: *E. coli* JM 109 (DE3) mit Plasmid pET5b mit DXPRI aus *Ara-bidopsis thaliana*. Die Bildung von ME kann effektiv inhibiert werden durch Verwendung von Fosmidomycin in verschiedenen Konzentrationen. Dies zeigt den "mode-of-action" von Fosmidomycin als Inhibitor der DXPRI.

25

Beispiel 3

Herstellung des Substrats 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) für den Enzymassay

30

Für die Herstellung von DOXP wurde aus *Chlamydomonas reinhardtii* klonierte DOXS verwendet (pET5b, *E. coli* JM109(DE3)).

35

Enzymextrakte aus mit IPTG induzierten *E. coli*-Zellen wurde mit [3-<sup>14</sup>C]-Pyruvat und DL-GAP inkubiert. Die Reaktion wurde abge- stoppt nach 30 min. durch Hitzedenaturierung der Proteine. Nach Abzentrifugieren wurde der Umsatz des radioaktiven Pyruvats mittels DC/Autoradiographie überprüft und der Überstand als Substrat für die Reduktoisomerase verwendet.

40

DOXP als Reaktionsprodukt wurde nach folgenden Kriterien identifiziert:

45

1. Es entsteht ein radioaktives Produkt, welches nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase sich in DC-Trennungen weniger polar verhält. Dies legt nahe, daß ein phosphoryliertes Produkt aus  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat und GAP gebildet wurde.
- 5 2. Das dephosphorylierte Produkt läuft in der DC (Kieselgel, Aceton/Ethylacetat/Wasser-50/50/2) gleich mit einer synthetischen Probe von 1-Desoxy-D-Xylulose.
- 10 10 Der Reaktionsansatz enthielt Proteinextrakt (20  $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$  Ansatz), Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM, DTT 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Na-EDTA 500  $\mu\text{M}$ , PMSF 100  $\mu\text{M}$ , NaF 5 mM, TPP 1 mM, Na-Pyruvat 1 mM, Na-[2- $^{14}\text{C}$ ] Pyruvat 20 KBq/100  $\mu\text{l}$  und DL-Glycerinaldehyd-3-Phosphat 3,75 mM.

15

## Beispiel 4

Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI in den Pflanzentransformationsvektor pBin19AR-TP

20

Zur Klonierung der DXPRI in einen binären Vektor wurden die Primer so gewählt, daß nach Restriktionsverdau und Ligation in pBin19AR-TP (Promega) die kodierende Sequenz ab der N-terminalen ersten konservierten Sequenz im Leserahmen der Proteintranslation 25 einligiert wird.

AtrvpBin1	5' TCA <u>GGATCC</u> GGCGCCTCGTCAATCT 3'
AtrrpBin2	5' GAC <u>CCCCGGG</u> TTCTCCAACAAACCAATTCT 3'

30

Die Primer AtrvpBin1 und AtrrpBin2 enthielten eine BamHI- bzw. eine SmaI-Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-Produkt (AtrvpBin1/AtrrpBin2) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit BamHI und SmaI verdaut. Zur Ligation wurden der Vektor pBin19AR-TP ebenfalls mit BamHI und SmaI geschnitten, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid 35 gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Das Konstrukt ist in Abbildung 4 dargestellt.

40

## Beispiel 5

## Herstellung von DXPRI-Antisense-Konstrukten

Zur Klonierung der DXPRI in einen binären Vektor in Antisense-45 Orientierung wurden folgende Primer gewählt.

AtrvpBin3	5' TCAC <u>CCCCGGG</u> GGCGCCTCGTCAATCT 3'
-----------	--

AtrrpBin4 5' GACGGATCCTTCTCCAACAACCAATTCT 3'

Die Primer AtrvpBin3 und AtrrpBin4 enthielten eine SmaI- bzw. eine BamHI- Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-  
5 Produkt (AtrvpBin3/AtrrpBin4) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit SmaI und BamHI verdaut. Zur Ligation wurden der Vektor pBin19AR-TP ebenfalls mit SmaI und BamHI geschnitten, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das  
10 Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Das Konstrukt ist in Abbildung 5 dargestellt.

Tabakpflanzen mit reduzierter DXPRI-Aktivität wurden einer Selbststung unterzogen und der erhaltene Samen geerntet. Zur weiteren  
15 Analyse der Pflanzen wurde Samen aus der F1-Generation verwendet.

Alle untersuchten Antisense-Pflanzen zeigten hinsichtlich der Pflanzengröße deutliche Unterschiede auf. Es wurden Pflanzen gefunden, die die gleiche Größe hatten wie der Wildtyp, bis hin zu  
20 ganz kleinen Pflanzen. Die nachfolgenden Generationen waren also nicht einheitlich. Dies gilt auch für die Reduktion in der DXPRI-Aktivität, die innerhalb einer Linie nicht einheitlich war, d.h. man kann eine Linie nicht durch eine spezifische Reduktion in der DXPRI-Aktivität definieren, sondern die Linien spalten auf (Sedo-  
25 heptulose-1,7-Bisphosphatase-antisense-Tabak-Pflanzen weisen ein vergleichbares Phänomen auf; vgl. Harrison et al. 1998, Planta 204: 27-36).

Die Biomassen-Analyse ergab eine Korrelation zwischen Reduktion  
30 der DXPRI-Aktivität und Reduktion in der Biomasse.

#### Beispiel 6

##### Extraktion und Detektion von Tocopherol

35 Extraktionsverfahren:

- 100 mg Feuchtgewicht Blattmaterial
- Extraktionspuffer : 80 % Ethanol, 10 mM Hepes pH 7,0, 1 mM  
40 Ascorbat
- Extraktion: 1:5 ( w/v )
- Inkubation bei 50°C, 30 Minuten
- Keine Zentrifugation
- Zugabe von ½ Volumen n-Hexan zu dem Extrakt
- Vortex und Zentrifugation ( 5 Minuten, Raumtemperatur )  
45
- Gewinnung der oberen sehr grün gefärbten Phase
- Wiederholung der n-Hexan Extraktion mit der unteren Phase

21

- Vereinigung der n-Hexan Phasen
- Vakuum Trocknung ( 2-3 Stunden für 1 ml n-Hexan bei Raumtemperatur )
- Wiederauflösung des Rückstandes in ca. 1/5 des ursprünglichen

5 n-Hexan Volumens

- Injektion von 30 - 50 µl auf die HPLC
- HPLC-Detektion für Tocopherol
- Detektion der Fluoreszenz: Anregung bei 295 nm, Emission bei 330 nm

10 - Säule: RP-18 ( Nucleosil 100, C18, 3µm, Fa. Knauer )

- Isokratisches System: n-Hexan plus 0,2 % 2-Propanol
- Fluß: 0,8 ml/min ( Druck: 110 bar )
- Standards von Sigma oder Merck
- Laufzeit: 15 Minuten

15

Beispiel 7

Extraktion phenolischer Substanzen aus Blättern und HPLC-Analytik

20 Die Extraktion phenolischer Substanzen aus Blättern wurde wie bei Yao et al., The Plant Cell, 7 (1995), 1787 - beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

25

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen

(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN).

30 Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DXPRI ( SEQ-ID No. 1), kloniert wie in Beispiel 4 beschrieben in den Transformationsvektor pBin19AR-TP, transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer

35 unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension

40 gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin

45 (BAP), 0.2mg/l Naphtylessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf

hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

Beispiel 9

5

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Prototyp 10 koll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

15 Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden das bereits in Beispiel 4 beschriebene binäre Konstrukt mit der gesamten cDNA der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* ( SEQ-ID No.1 ) verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren

20 wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H<sub>2</sub>O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v

25 Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H<sub>2</sub>O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices

30 entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

35

Vom *Agrobacterium*-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der

40 Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0.3 eingestellt.

45 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-

Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-  
5 Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-  
10 fernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petri-  
schalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kana-  
mycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor  
15 verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-  
Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regenera-  
tion ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in  
20 Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

#### Beispiel 10

25 **Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Tabak**

Die Überexpression der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* in Tabak erfolgte wie in Beispiel 8 beschrieben.

30 Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Takakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Toco-  
pherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Verg-  
35 leich zur nicht transforierten Pflanze erhöht.

#### Beispiel 11

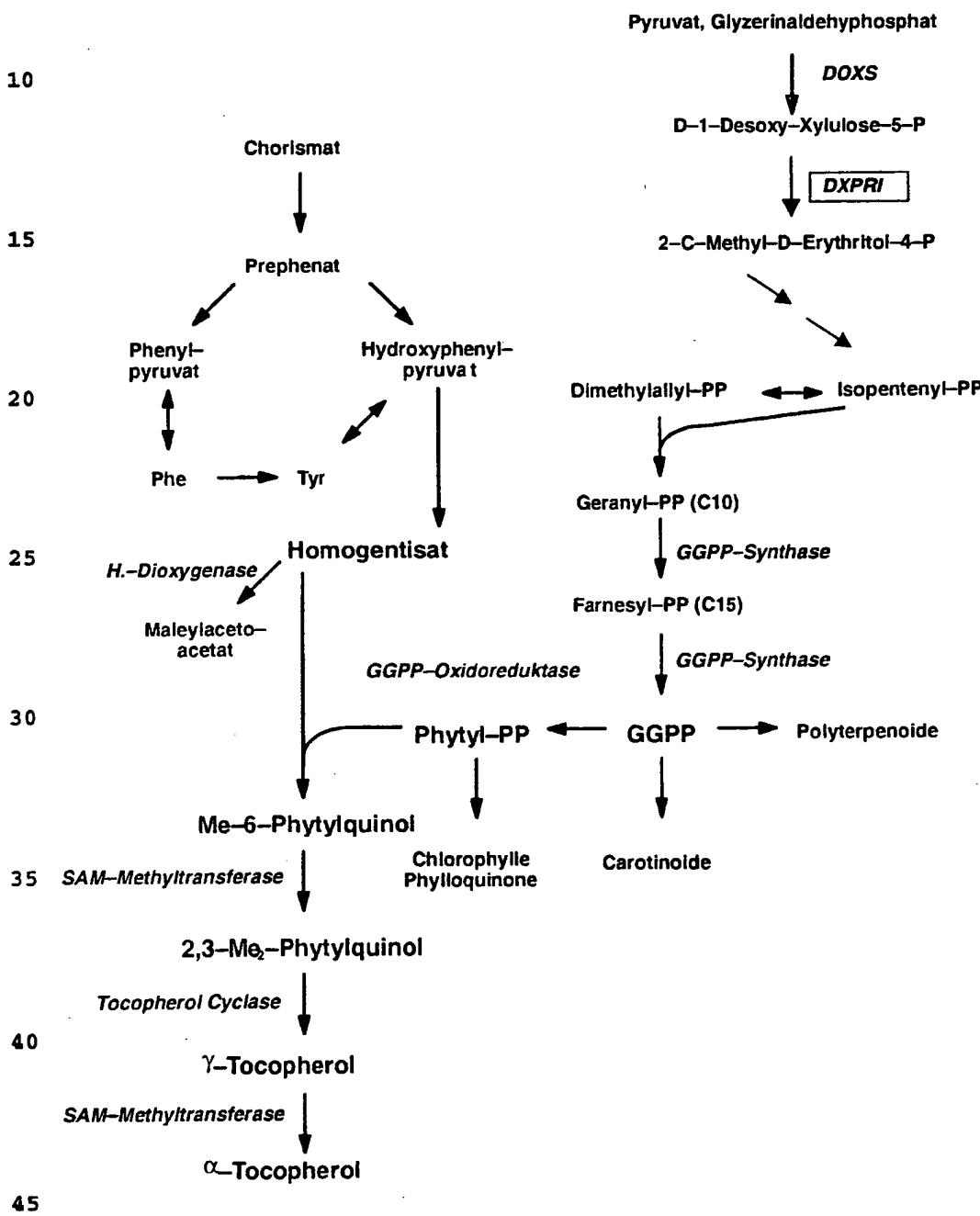
**Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps**

40 Die cDNA der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* ( SEQ-No.1 ) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezi-  
fische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherol-  
45 gehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus an-  
gezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtp-

flanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

5 Abbildung 1

Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels



## Abbildung 2

Nukleotid-Sequenz der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana*

5 GCGCCTCGTCAATCTGGGATGGACCAAAACCCATCTCTATCGTGGATCTACTGGTCTATTGG  
 CACTCAGACATTGGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTCAAGAGTTGGCTCTAGCTGCTG  
 GTTCGAATGTTACTCTACTTGCTGATCAGGTAAAGGAGATTAAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGA  
 AACGAGTCACTGATTAATGAGCTTAAAGAGGCTTAGCTGATTGGACTATAAACTCGAGATTAT  
 TCCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCGACATCCGAAGCTGTAACC GTTACCGGAA  
 10 TAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTGCTGCAATTGAAAGCAGGAAAGGACATTGCTCTT  
 GCAAACAAAGAGACATTAATCGCAGGTGGCTTTCGTGCTCCGCTTGCCAACAAACATAATGT  
 AAAGATTCTTCCGGCAGATTCAAGAACATCTGCCATATTCAGTGATTCAAGGTTGCCTGAAG  
 GCGCTCTGCGCAAGATAATCTGACTGCATCTGGTGGAGCTTTAGGGATTGGCTGTCGAAAAG  
 CTAAAGGAAGTTAAAGTAGCGATGCGTTGAAGCATTGAAACTGGAACATGGAAAGAAAATCAC  
 15 TGTGGACTCTGCTACGCTTTCAACAAGGGCTTGAGGTCATTGAAAGCGCATTATTGTTGGAG  
 CTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTCATCCGAAAGTATCATACTACATCCATGATTGAAACAA  
 CAGGATTCTGCTGCTCAATTGGTTGCCGATATGGCTTACCGATTCTACACCAT  
 GTCATGGCCCGATAGAGTTCCCTGTTGAAGTAACCTGGCCAAGACTTGACCTTGCAAACCTCG  
 GTTCATTGACTTTCAAGAACAGACAATGTGAAATACCCATCCATGGATCTGCTTATGCTGCT  
 20 GGACGAGCTGGAGGGCACAATGACTGGAGTTCTCAGCGCCGCCATTGAGAAAGCTGTTGAAATGTT  
 CATTGATGAAAAGATAAGCTATTGGATATCTCAAGGTTGGAATTACATGCGATAAACATC  
 GAAACGAGTTGGTAACATCACCCTCTGAAAGAGATTGTCACTATGACTTGTGGCACGTGAA  
 TATGCCCGAATGTGCAAGCTTCTCTGGTCTAGGCCAGTTCATGCATGA

## Abbildung 3

Nukleotid-Sequenz der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* als Fusionssequenz

30 1 ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGTCGGGATCCGGCGCTCG  
 51 51 TCAATCTTGGGATGGACCAAAACCCATCTCTATCGTGGATCTACTGGTT  
 101 101 CTATTGGCACTCAGACATTGGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATT  
 151 151 AGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTGGTCAATGTTACTCTACTTGCTGATCA  
 201 35 201 GGTAAAGGAGATTAAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGAAACGAGTCACTGA  
 251 251 TTAATGAGCTTAAAGAGGCTTAGCTGATTGGACTATAAAACTCGAGATT  
 301 301 ATTCCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCGACATCCGAAGCTGT  
 351 351 AACCGTTGTTACCGGAATAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTG  
 401 401 CTGCAATTGAAGCAGGAAGGACATTGCTCTGCAAACAAAGAGACATTA  
 451 451 ATCGCAGGTGGCTTTCGTGCTTCCGTTGCCAACAAACATAATGAAA  
 501 501 GATTCTCCGGCAGATTCAAGAACATTCTGCCATATTCAGTGATTCAAG  
 551 551 GTTTGCCCTGAAGGCGCTCTGCGCAAGATAATCTGACTGCATCTGGTGG  
 601 601 GCTTTAGGGATTGGCTGTCGAAAGCTAAAGGAAGTTAAAGTAGCGGA  
 651 651 TGCCTTGAAGCATTCCAAACTGGAACATGGAAAGAAAATCACTGTGGACT  
 701 45 701 CTGCTACGCTTTCAACAAGGGCTTGAGGTCATTGAAAGCGCATTATTG  
 751 751 TTTGGAGCTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTCACTCCGCAAAGTAT  
 801 801 CATACATTCCATGATTGAAACACAGGATTCACTGTGCTCAATTGG

26

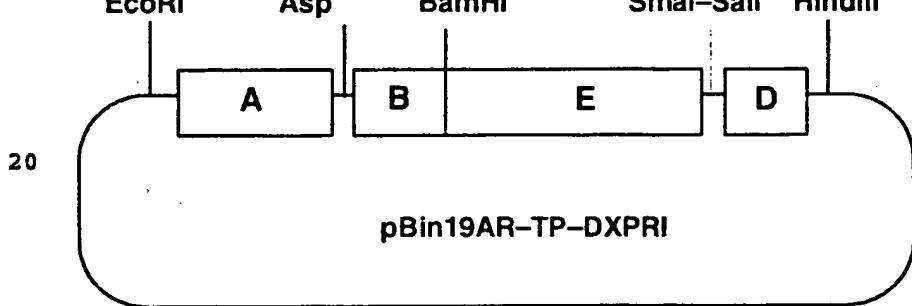
851 GTTGGCCTGATATCGTTACCGATTCTACACCATGTCATGGCCCGAT  
 901 AGAGTTCCCTGTTCTGAAGTAACCTGGCCAAGACTTGACCTTGCAAAC  
 951 CGGTTCAATTGACTTCAAGAAACCAGACAATGTGAAATACCCATCCATGG  
 1001 ATCTTGCTTATGCTGCTGGACGAGCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTC  
 5 1051 AGCGCCGCCAATGAGAAAGCTGTTGAAATGTTGATGAAAAGATAAG  
 1101 CTATTGATATCTTCAAGGTTGGAATTAAACATGCGATAAACATCGAA  
 1151 ACGAGTTGGTAACATCACCGTCTTGAAGAGATTGTTCACTATGACTTG  
 1201 TGGGCACGTGAATATGCCGCGAATGTGCAGCTTCTGGTGTAGGCC  
 1251 AGTTCATGCATGAAGAATTGGTTGTTGGAAGAAGAATTG

10

Abbildung 4

Binärer Vektor zur Überexpression des DXPRI-Gens aus *Arabidopsis thaliana* im Plastiden transgener Pflanzen

15

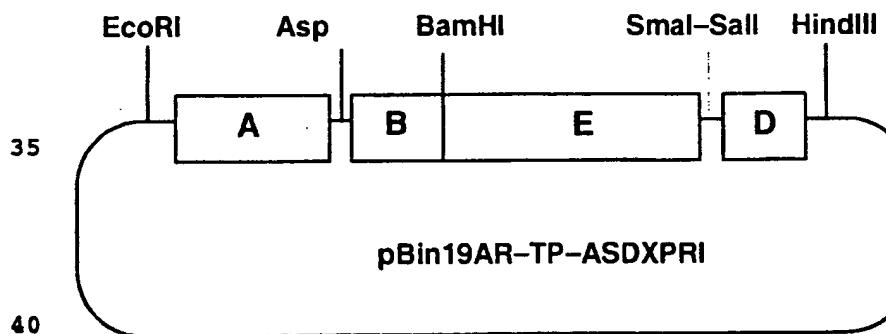


20

Abbildung 5

Binärer Vektor zur Antisense-Expression des DXPRI-Gens aus *Arabidopsis thaliana* im Plastiden transgener Pflanzen

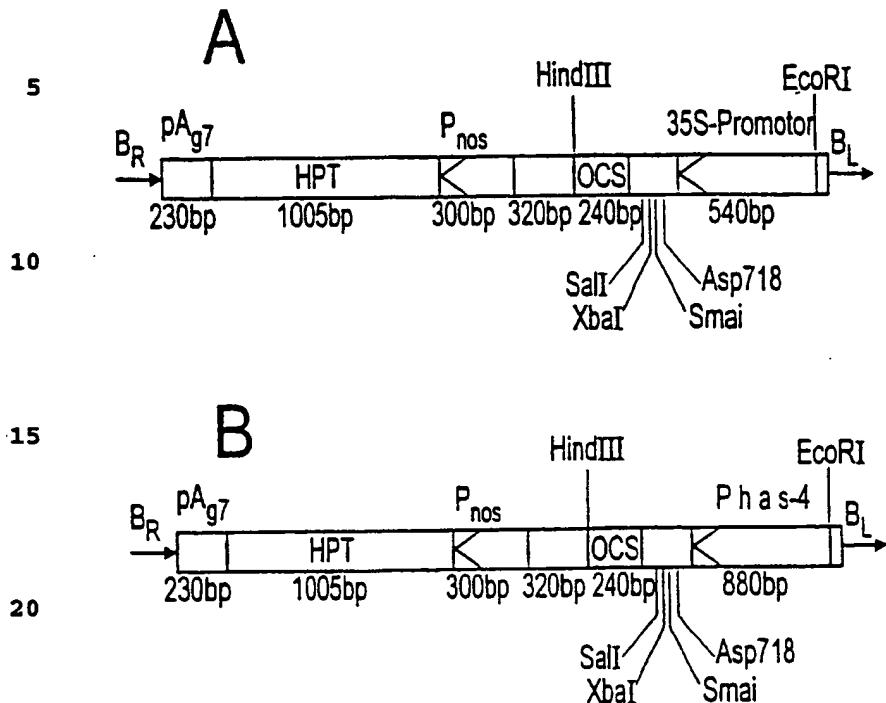
30



40

45

Abbildung 6



25 Abbildung 7

Nachweis der Hemmbarkeit mit Fosmidomycin und Cofaktorbedarf der DXPRI:

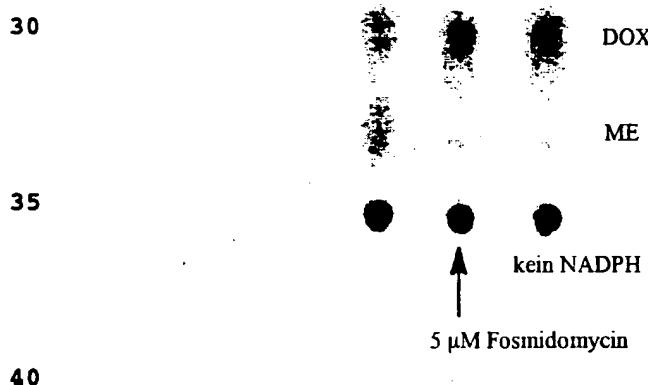


Abbildung 8

Einfluß von Fosmidomycin auf die Neubildung von Pigmenten in etiolierten Gerstenkeimlingen

5

	Chlorophylle µg / g TG bzw. Hemmung in %	Carotinoide µg / g TG bzw. Hemmung in %	Pigment-Verhältnisse	
			a b	(a+b) (x+c)
Kontrolle	4361 (0 %)	603 (0 %)	3.65	7.2
Fosmidomycin				
$10^{-6}$ M	4201 (4 %)	552 (8 %)	3.59	7.6
$10^{-5}$ M	2747 (37 %)	179 (70 %)	4.74	15.3
$10^{-4}$ M	428 (91 %)	0 (100 %)	12.32	∞

25 Abbildung 9

Heterologe Expression der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli*

30

27 2 5 10 20 50 100 µg Protein / 20 µl

K

35



40

45

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 und damit hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine pflanzliche 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase.
2. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.
3. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.
4. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
5. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
6. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
7. Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 5.
8. Pflanze nach Anspruch 7, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

**5 Zusammenfassung**

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.

**10**

**15**

**20**

**25**

**30**

**35**

**40**

**45**

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF AG

&lt;120&gt; Ueberexpression einer DNA-Sequenz codierend fuer eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

&lt;130&gt; 990380

&lt;140&gt; 0050-49943

&lt;141&gt; 1999-04-27

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1221

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1221)

&lt;400&gt; 1

gcg cct cgt caa tct tgg gat gga cca aaa ccc atc tct atc gtt gga 48  
Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly  
1 5 10 15tct act ggt tct att ggc act cag aca ttg gat att gtg gct gag aat 96  
Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn  
20 25 30cct gac aaa ttc aga gtt gtg gct cta gct gct ggt tcg aat gtt act 144  
Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr  
35 40 45cta ctt gct gat cag gta agg aga ttt aag cct gca ttg gtt gct gtt 192  
Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val  
50 55 60aga aac gag tca ctg att aat gag ctt aaa gag gct tta gct gat ttg 240  
Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu  
65 70 75 80gac tat aaa ctc gag att att cca gga gag caa gga gtg att gag gtt 288  
Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val

85

90

95

gcc cga cat ccc gaa gct gta acc gtt acc gga ata gta ggt tgt  
 Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys  
 100 105 110

gcg gga cta aag cct acg gtt gct gca att gaa gca gga aag gac att  
 Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile  
 115 120 125

gct ctt gca aac aaa gag aca tta atc gca ggt ggt cct ttc gtg ctt  
 Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu  
 130 135 140

ccg ctt gcc aac aaa cat aat gta aag att ctt ccg gca gat tca gaa  
 Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu  
 145 150 155 160

cat tct gcc ata ttt cag tgt att caa ggt ttg cct gaa ggc gct ctg  
 His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu  
 165 170 175

cgc aag ata atc ttg act gca tct ggt gga gct ttt agg gat tgg cct  
 Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro  
 180 185 190

gtc gaa aag cta aag gaa gtt aaa gta gcg gat gcg ttg aag cat cca  
 Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro  
 195 200 205

aac tgg aac atg gga aag aaa atc act gtg gac tct gct acg ctt ttc  
 Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe  
 210 215 220

aac aag ggt ctt gag gtc att gaa gcg cat tat ttg ttt gga gct gag  
 Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu  
 225 230 235 240

tat gac gat ata gag att gtc att cat ccg caa agt atc ata cat tcc  
 Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser  
 245 250 255

atg att gaa aca cag gat tca tct gtg ctt gct caa ttg ggt tgg cct  
 Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro  
 260 265 270

gat atg cgt tta ccg att ctc tac acc atg tca tgg ccc gat aga gtt  
 Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val  
 275 280 285

cct tgt tct gaa gta act tgg cca aga ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt	912		
Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly			
290	295	300	
tca ttg act ttc aag aaa cca gac aat gtg aaa tac cca tcc atg gat	960		
Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp			
305	310	315	320
ctt gct tat gct gct gga cga gct gga ggc aca atg act gga gtt ctc	1008		
Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu			
325	330	335	
agc gcc gcc aat gag aaa gct gtt gaa atg ttc att gat gaa aag ata	1056		
Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile			
340	345	350	
agc tat ttg gat atc ttc aag gtt gtg gaa tta aca tgc gat aaa cat	1104		
Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His			
355	360	365	
cga aac gag ttg gta aca tca ccg tct ctt gaa gag att gtt cac tat	1152		
Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr			
370	375	380	
gac ttg tgg gca cgt gaa tat gcc gcg aat gtg cag ctt tct tct ggt	1200		
Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly			
385	390	395	400
gct agg cca gtt cat gca tga	1221		
Ala Arg Pro Val His Ala			
405			
<210> 2			
<211> 406			
<212> PRT			
<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>			
<400> 2			
Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly			
1	5	10	15
Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn			
20	25	30	
Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr			
35	40	45	

Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val  
50 55 60

Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu  
65 70 75 80

Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val  
85 90 95

Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys  
100 105 110

Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile  
115 120 125

Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu  
130 135 140

Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu  
145 150 155 160

His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu  
165 170 175

Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro  
180 185 190

Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro  
195 200 205

Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe  
210 215 220

Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu  
225 230 235 240

Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser  
245 250 255

Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro  
260 265 270

Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val  
275 280 285

Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly  
290 295 300

Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp

305 310 315 320

Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu  
325 330 335Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile  
340 345 350Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His  
355 360 365Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr  
370 375 380Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly  
385 390 395 400Ala Arg Pro Val His Ala  
405

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1289

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1263)

&lt;400&gt; 3

atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ccg gcg cct 48  
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Ala Pro  
1 5 10 15cgt caa tct tgg gat gga cca aaa ccc atc tct atc gtt gga tct act 96  
Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr  
20 25 30ggt tct att ggc act cag aca ttg gat att gtg gct gag aat cct gac 144  
Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp  
35 40 45aaa ttc aga gtt gtg gct cta gct gct ggt tcg aat gtt act cta ctt 192  
Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu  
50 55 60gct gat cag gta agg aga ttt aag cct gca ttg gtt gct gtt aga aac 240  
Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn

65	70	75	80	
gag tca ctg att aat gag ctt aaa gag gct tta gct gat ttg gac tat				288
Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr				
85		90		95
aaa ctc gag att att cca gga gag caa gga gtc att gag gtt gcc cga				336
Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg				
100		105		110
cat ccc gaa gct gta acc gtt acc gga ata gta ggt tgt gcg gga				384
His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly				
115		120		125
cta aag cct acg gtt gct gca att gaa gca gga aag gac att gct ctt				432
Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu				
130		135		140
gca aac aaa gag aca tta atc gca ggt ggt cct ttc gtc ctt ccg ctt				480
Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu				
145		150		160
gcc aac aaa cat aat gta aag att ctt ccg gca gat tca gaa cat tct				528
Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser				
165		170		175
gcc ata ttt cag tgt att caa ggt ttg cct gaa ggc gct ctg cgc aag				576
Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys				
180		185		190
ata atc ttg act gca tct ggt gga gct ttt agg gat tgg cct gtc gaa				624
Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu				
195		200		205
aag cta aag gaa gtt aaa gta gcg gat gcg ttg aag cat cca aac tgg				672
Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp				
210		215		220
aac atg gga aag aaa atc act gtc gac tct gct acg ctt ttc aac aag				720
Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys				
225		230		235
ggt ctt gag gtc att gaa gcg cat tat ttg ttt gga gct gag tat gac				768
Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp				
245		250		255
gat ata gag att gtc att cat ccg caa agt atc ata cat tcc atg att				816
Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile				
260		265		270

gaa aca cag gat tca tct gtg ctt gct caa ttg ggt tgg cct gat atg . 864  
 Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met  
 275 280 285

cgt tta ccg att ctc tac acc atg tca tgg ccc gat aga gtt cct tgt 912  
 Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys  
 290 295 300

tct gaa gta act tgg cca aga ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt tca ttg 960  
 Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu  
 305 310 315 320

act ttc aag aaa cca gac aat gtg aaa tac cca tcc atg gat ctt gct 1008  
 Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala  
 325 330 335

tat gct gct gga cga gct gga ggc aca atg act gga gtt ctc agc gcc 1056  
 Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala  
 340 345 350

gcc aat gag aaa gct gtt gaa atg ttc att gat gaa aag ata agc tat 1104  
 Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr  
 355 360 365

ttg gat atc ttc aag gtt gtg gaa tta aca tgc gat aaa cat cga aac 1152  
 Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn  
 370 375 380

gag ttg gta aca tca ccg tct ctt gaa gag att gtt cac tat gac ttg 1200  
 Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu  
 385 390 395 400

tgg gca cgt gaa tat gcc gcg aat gtg cag ctt tct tct ggt gct agg 1248  
 Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg  
 405 410 415

cca gtt cat gca tga agaattggtt gttggaaagaa gaattc 1289  
 Pro Val His Ala  
 420

<210> 4  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4  
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Ala Pro

1

5

10

15

Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr  
20 25 30

Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp  
35 40 45

Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu  
50 55 60

Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn  
65 70 75 80

Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr  
85 90 95

Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg  
100 105 110

His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly  
115 120 125

Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu  
130 135 140

Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu  
145 150 155 160

Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser  
165 170 175

Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys  
180 185 190

Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu  
195 200 205

Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp  
210 215 220

Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys  
225 230 235 240

Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp  
245 250 255

Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile  
260 265 270

Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met  
275 280 285

Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys  
290 295 300

Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu  
305 310 315 320

Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala  
325 330 335

Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala  
340 345 350

Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr  
355 360 365

Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn  
370 375 380

Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu  
385 390 395 400

Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg  
405 410 415

Pro Val His Ala  
420